

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/29, 15/63, 5/10, A01H 1/00, 5/00</p>		A1	<p>(11) 国際公開番号 WO98/40489</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月17日(17.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00955</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月10日(10.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/55208 1997年3月10日(10.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 丸田嘉幸(MARUTA, Yoshiyuki)(JP/JP) 斎藤秀章(SAITO, Hideaki)(JP/JP) 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 杜本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, ID, JP, KR, MX, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: ANTISENSE BASE SEQUENCES</p> <p>(54)発明の名称 アンチセンス塩基配列</p> <p>(57) Abstract A novel technique for enhancing, in the techniques for inhibiting the synthesis of proteins, the inhibitory effects with the use of antisense base sequences. Specifically, antisense base sequences containing two or more sequences of desired structural genes or parts of the same consecutively linked in the antisense direction; expression vectors having the above antisense base sequences; products of transformation by the above expression vectors; and a method for inhibiting the expression of proteins by using the above antisense base sequences.</p>			

(57) 要約

本発明は、アンチセンス塩基配列を用いてタンパク質合成を抑制する技術において、その抑制能力を高める新規な技術を提供することを目的とする。即ち、本発明は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列、上記アンチセンス塩基配列を有する発現ベクター、上記発現ベクターにより形質転換された形質転換体、および上記アンチセンス塩基配列を使用するタンパク質の発現の抑制方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TG	チャゴー
AU	オーストラリア	GGB	英國	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
AZ	アゼルバイジャン	GGE	グルジア	MD	モルドヴァ	TM	トルクメニスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TT	トリニダッド・トバゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	ML	マケドニア共和国	UG	ウクライナ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	MN	マリ	UG	ウガンダ
BR	ブルガリア	GU	ギリシャ	MR	モンゴル	UZ	米国
BR	ペナン	HU	ハンガリー	MW	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
BR	ブラジル	I	インドネシア	MX	マラウイ	VN	ヴィエトナム
BY	ベラルーシ	DE	アイルランド	NE	メキシコ	YU	ヨーロースラヴィア
CA	カナダ	EL	イスラエル	NL	ニジエール	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ	IS	アイスランド	NO	オランダ		
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NZ	オーランド		
CH	スイス	JP	日本	PL	ニューランド		
CM	コートジボアール	KE	ケニア	PT	ボーランド		
CN	カメールーン	KG	キルギス	RO	ボルトガル		
CU	中国	KR	北朝鮮	RU	ルーマニア		
CY	キューバ	KRZ	韓国	SD	ロシアン		
CZ	キプロス	KZ	カザフスタン	SE	スチダム		
DE	チエニコ	LC	セント・ルシア	SG	スウェーデン		
DE	ドイツ	L	リヒテンシュタイン	SI	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	リヒテン・ランカ	SK	スロベニア		
EE	エストニア	LRS	スリベリア	SL	スロ伐キア		
ES	スペイン	LS	リレソト		セレ・レオーネ		

明細書

アンチセンス塩基配列

発明の属する分野

本発明は、アンチセンス塩基配列を用いたタンパク質合成を抑制する技術において、その抑制能力を高める技術に関するものである。

従来の技術

タンパク質の合成の情報となるメッセンジャーRNAのようなある機能を持ったRNAに対して相補的塩基配列を持つRNAがそのRNAの機能を抑制する働きがあることが知られている。これはアンチセンスRNAと総称されるものであり、遺伝子組換え技術によって、アンチセンスRNAを導入した植物を人工的に作り出す研究も進められている。このようなアンチセンスRNAを発現させるための遺伝子としては、プロモーターの下流に目的タンパク質をコードするDNA配列(cDNA、あるいはゲノムDNA)の一部、あるいは完全長の配列をアンチセンスの方向につないだものが用いられている。

このようなアンチセンスを用いた技術としては、以下のものが挙げられる。

- (1) 花色色素合成に関与しているチャルコン合成酵素のアンチセンスRNAを産生する組み換えペチュニアを作製し、野生型とは花色の異なるペチュニアが得られている (EP 3 4 1 8 8 5 A)。
- (2) トマト果実の軟質化に重要な役割を果しているポリガラクトロナーゼ遺伝子が導入されたアンチセンスRNAによって発現が抑制され、野生型よりも保存の効くトマトが作り出されている (EP 8 9 1 1 1 5 A)。
- (3) Meltonらは β -グロビンcDNAの完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:144-148(1985))。
- (4) Stockhausらは光合成の光化学系に関与する10kDタンパク質cDNAの完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (The EMBO Journal 9:3013-3021(1990))。

(5) Alexander らは花色色素合成に関与しているチャルコン合成酵素 c DNA の完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 333:866-869 (1988))。

5 (6) Hamilton らはエチレン合成酵素 (ACC-oxidase) c DNA の完全長の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 346:284-287 (1990))。

(7) Smith らはポリガラクツロナーゼ c DNA の一部の配列をアンチセンス遺伝子として用いている (Nature 334:724-726 (1988))。

10 このように、従来はアンチセンス遺伝子として、目的タンパク質をコードしている塩基配列のうち、その一部、あるいは完全長の塩基配列を、単に発現プロモーターの下流に逆向きに挿入することにより作製している。

また、アンチセンス RNA による目的タンパク質の低減化はいくつか報告されているが、植物種子の貯蔵タンパク質などのように生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させた報告はない。アンチセンス RNA を用いて生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させるには、そのタンパク質の合成される部位に該アンチセンス RNA を多量に作らせる必要がある。その手段の一つとして、アンチセンス遺伝子が多コピーになるように導入させる方法が考えられるが、宿主が植物などのように遺伝的にホモ固定させたい場合、多コピーで導入された遺伝子を自殖によって固定させるのは多大な労力を要する。その他の手段として、20 アンチセンス遺伝子を発現させるプロモーターの活性を高める方法が考えられるが、容易にはできない。

生体内に多量に存在しているタンパク質を低減させるには、これまで報告されているアンチセンス遺伝子では困難である。

25

発明の概要

アンチセンス遺伝子はその発現量が高くなるほど、タンパク質合成抑制の割合も高くなると考えられている (Melton D. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 144-148, Ecker J. R. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 53 72-5376)。アンチセンス遺伝子の発現量を高める方法としては、上述したよう

にアンチセンス遺伝子の発現に用いるプロモーターの活性を高める方法、あるいはアンチセンス遺伝子の導入数を高める方法等が考えられるが、上述したような問題点がある。本発明は、生体内におけるタンパク質合成の抑制能力を高めさせ、生体内に多量に存在しているタンパク質をも低減させることができるアンチセンス遺伝子を提供することを目的とするものである。

所望の構造遺伝子の完全長の塩基配列をアンチセンスに導入すると、確かに所望の構造遺伝子による目的タンパク質の合成を制御する効果が、ある程度は高くなる。しかし、この方法は所望の構造遺伝子の完全長の塩基配列をアンチセンス型に導入するので、未知のオープンリーディングフレームが出現し、導入した個体に予期しないタンパク質を発現させる可能性が生じてしまう。特に食用に供される植物の場合、健康への安全性及び味の変化などを検討しなくてはならない。上記のような予期しないタンパク質の発現を抑制させる方法として、構造遺伝子の一部の配列、即ち、オープンリーディングフレームのない部分配列、あるいはオープンリーディングフレームを人為的に欠失させた部分配列を用いることで解決できる。しかし、所望の構造遺伝子の一部を単数個導入するだけでは、所望の構造遺伝子による目的タンパク質の合成を制御する効果が、希望する程度には得られない。そこで、本発明者等は、以上の問題を解決する方法、即ち、未知のタンパク質を発現させることなく、目的タンパク質の合成を制御する効果を高める方法を考えた。その結果、所望の構造遺伝子の一部を複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入する方法を見出し、本発明を完成させた。

図面の簡単な説明

図1は、*in vitro* RNA合成に用いた遺伝子の構造を示す模式図を示す。

図2は、小麦胚芽抽出液による翻訳産物の解析のイメージ画像である。

図3は、グルテリン合成量の変化を示すグラフを示す。

図4は、形質転換に用いたプラスミドベクターの構造を示す模式図を示す。

図5は、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析を示すイメージ画像である。

図6は、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析を示すイメージ画像である。

図7は、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のノーザン分析を示すイメージ画像である。

5 図8は、形質転換に用いたプラスミドベクターの構造を示す模式図を示す。

発明の詳細な説明

本発明者は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入することにより、所望の構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を効果的に抑制できることを見い出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明の一つの側面によれば、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列が提供される。本発明のアンチセンス塩基配列から転写されるアンチセンスRNAは、1分子中に目的タンパク質をコードするmRNAの一部分に対して相補的なRNA配列が複数個連続して存在する。したがって、目的タンパク質をコードするmRNAと生体内で対合し、該タンパク質の生体内での発現を抑制する可能性を高くすることができると考えられる。このため、この連続配列を持ったアンチセンスRNAは、連続配列を持たないアンチセンスRNAよりも目的タンパク質の合成を抑制する効果が高いのである。

また本発明の別の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクター、上記発現ベクターにより形質転換された形質転換体、並びに本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入することを含む、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を抑制する方法が提供される。

25

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明の第1の側面によれば、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結されたアンチセンス塩基配列が提供される。

本発明でいう「所望の構造遺伝子」とは、発現を低減させたいタンパク質をコ

ードする遺伝子を意味するものである。ここで、発現を低減させたいタンパク質としては、生体内で産生されるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、本発明のアンチセンス塩基配列がより有効に働くという観点から、生体内で多量に発現するタンパク質が好ましい。このようなタンパク質の例としては、植物種子の貯蔵タンパク質が挙げられる。より具体的な例としては、例えば、穀類のグルテリン、プロラミン、グロブリン、アルブミン等が挙げられ、特にイネのグルテリン、コムギのグルテニン、トウモロコシのゼイン、オオムギのホールデインは種子中に多量に存在している。その他の例としては、ダイズのコングリシン、インゲンマメのファゼオリン、イモ類の主要タンパク質であるジャガイモのパタチン、サツマイモのスポラミン等が挙げられる。

後述する実施例においては、コメの貯蔵タンパク質グルテリンAおよびBを用いているが、これは本発明の実施態様の一例を示すものに過ぎない。

本発明においては、この構造遺伝子の全配列を用いてもよく、またその一部の配列を用いてもよい。一部の配列を用いる場合は、構造遺伝子の5'側の配列を用いることが好ましいが、これは、構造遺伝子の翻訳開始部位に対応する相補配列を使用する方が、より効果的に目的タンパク質の発現を低下させることができると考えられるためである。

また、一部の配列を使用する場合、配列の長さは特に限定されるものではないが、一般的には少なくとも45塩基以上であることが好ましく、特に好ましくは少なくとも300塩基以上である（多田ら（1996）育種学雑誌46, 403-407）。

本発明のアンチセンス塩基配列は、上記の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むものである。

本明細書中において、「アンチセンス方向」とは、宿主細胞に内在するDNA配列に、少なくとも一部相補的となる遺伝子を含有するDNA配列がもたらされる方向のことである。この相補的遺伝子からの転写物は、宿主に内在性のRNA、特にmRNA上に存在する配列に相補的である配列を有している。

また本明細書中において、「複数個」とは、少なくとも2個以上の意味であるが、好ましくは4個以上、特に好ましくは8個以上を意味する。

さらに、本明細書中において、「連続して」とは、これらの配列の間に他の塩

基が存在しないか、存在したとしても少なくともプロモーター配列等の構造遺伝子の発現に大きな影響を及ぼす配列は連結されていないことを意味するものである。

本発明においては、アンチセンス塩基配列を複数個連結する方法は、遺伝子工学技術において通常用いられるものを適宜用いることができ、特に限定されるものではない。

例えば、クローニングされた所望の構造遺伝子を含むプラスミドから、構造遺伝子の全長を含むインサート配列または構造遺伝子の一部を含むインサート配列を切り出し、このインサート配列の両末端に異なる制限部位をリンカーの付加などにより導入しておく。この場合、続くクローニングに使用するベクター（例えば、プラスミドベクター）のクローニング部位の制限配列を考慮に入れて、得られるプラスミドが当該構造遺伝子をアンチセンス方向に含むように、インサート配列の両末端の制限部位を設計することが重要である。次いで、両末端に異なる制限部位を有するベクターと、この制限部位に対応する制限部位を両末端に有する上記インサート配列をライゲーションすることにより、アンチセンス塩基配列を1つ含む遺伝子構築物が得られる。

次いで、この構築物をさらに制限酵素で処理して直線状にし、その両方の末端に異なる制限部位を導入しておく。そして上記と同様に、構造遺伝子の全長または一部を含むインサート配列の両方の末端に対応する制限部位を導入した配列を作製する。次いで、これらをライゲーションすることにより、アンチセンス塩基配列を2つ含む遺伝子構築物が得られる。

以下、これと同様の操作を反復することにより、任意の数のアンチセンス塩基配列を含む遺伝子構築物を得ることができる。なお、アンチセンス塩基配列を2つ含む遺伝子構築物と、そのインサート配列とを使用することにより、アンチセンス塩基配列を4つ含む遺伝子構築物を1回のライゲーションにより作成することができる。同様に、アンチセンス塩基配列を4つ含む遺伝子構築物と、そのインサート配列とを使用することにより、アンチセンス塩基配列を8つ含む遺伝子構築物を1回のライゲーションにより作成することができる。

なお、本発明のアンチセンス塩基配列の実施態様の一つとしては、所望の構造

遺伝子もしくはその一部の配列が、異なる種類の複数の構造遺伝子もしくはその一部の配列から構成されている、アンチセンス塩基配列が含まれる。即ち、異なる種類の複数の構造遺伝子の発現を同時に抑制したい場合は、プロモーターの下流に本発明のアンチセンス塩基配列を連結し、これにターミネーターを連結させた形質転換用構築遺伝子を複数個連結した形質転換用構築遺伝子を用いることができる。それぞれの構築遺伝子に、それぞれ異なる種類の構造遺伝子もしくはその一部をアンチセンス方向に連続して連結したアンチセンス配列を用いることにより、単一の形質転換用構築遺伝子を導入することにより複数の構造遺伝子の発現を抑制することを可能とするものである。

10 本発明の第2の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクターが提供される。

発現ベクターを構築する際に使用する、プロモーター、ターミネーター等の調節配列、形質転換に用いるベクターなどは、遺伝子工学技術において通常用いられるものを適宜用いることができ、特に限定されるものではない。

15 プロモーターの例としては、例えばグルテリンプロモーター、コングリシニンプロモーター、ファゼオリンプロモーター、ADHプロモーター、熱ショックプロモーター、組織特異性プロモーター、果実の成熟に関連するプロモーター、プロラミンプロモーター、RUB Pカルボキシラーゼ小サブユニットのプロモーター、カリフラワーモザイクウィルスのプロモーターなどが挙げられる。

20 ターミネーターの例としては、例えば、ノバリン合成酵素のターミネーター、カリフラワーモザイクウィルスのターミネーターなどが挙げられる。

ベクターの例としては、例えば、pUCプラスミドベクター、pBRプラスミドベクター、T1プラスミドベクター、R1プラスミドベクターなどが挙げられる。

25 本発明の第3の側面によれば、本発明の発現ベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

形質転換される生物体の種類は特に限定されず、植物、動物、微生物等から目的に応じ任意に選択することができる。本発明においては、形質転換体は、好ましくは植物、特には単子葉植物および双子葉植物等の高等植物であり、特に好ま

しくは、例えば穀類（イネ、コムギ、トウモロコシ、オオムギなど）、ダイズ、インゲンマメ、またはイモ類（ジャガイモ、サツマイモなど）である。

本発明の第4の側面によれば、本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入することにより、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内5における発現を抑制する方法が提供される。

本発明のアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子に導入する方法は、特に限定されず目的に応じて適宜好適な形質転換技術を使用することができる。

例えば、植物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、アグロバクテリウム ツメファシエンスを用いる方法、プロトプラストによるエレクトロポレーション、リポゾーム融合、マイクロインジェクション等の10方法が挙げられる。

アンチセンス塩基配列導入に成功した植物細胞は、抗生素質耐性細胞の選抜などの方法によりスクリーニングすることができる。このようにして形質転換された植物細胞をカルス培養して完全植物体に再生することができる。再生した植物15は、通常の交配法で安定した品種へ固定することができる。

動物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、エレクトロポレーション、リポゾーム融合、マイクロインジェクション等の方法が挙げられる。

微生物の細胞のゲノム遺伝子にアンチセンス塩基配列を導入するためには、カルシウム法、エレクトロポレーション等の方法が挙げられる。

以下の実施例により本発明をより具体的に例示するが、本発明は実施例により20限定されるものではない。

実施例

25 本実施例においては、アンチセンスRNAを用いて、コメの貯蔵タンパク質グルテリンの発現を抑制し、コメ胚乳中のグルテリン含量を低減させることを目的とした。コメのグルテリンは、イネゲノム当たり10個以上の遺伝子があり、それらは塩基配列の相同意が65%を示すグルテリンAとグルテリンBに分けられる。コメのグルテリン含量を低減させることは、醸造用の酒米としての利用に適

している。

以下に実施例のステップを簡単にまとめる。なお、以下の実施例において特に断りがない限り Maniatis T. et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982)) 記載の方法に従った。

- 5 (a) コメの貯蔵タンパク質グルテリンAとグルテリンBの完全長c DNAを単離した(Okitaら (1989) Journal Biochemical Chemistry 264: 12573-12581)。なお、グルテリンA完全長c DNA配列を配列表の配列番号1に、グルテリンB完全長c DNA配列を配列表の配列番号2に示す。
- 10 (b) グルテリンA完全長c DNAの5' 上流312 bpsの配列を、複数個直列に、アンチセンスの方向に連結させた。
- (c) 上記連結アンチセンス遺伝子を錫型にin vitroで転写反応を行い、連結アンチセンスRNAを作製した。
- (d) 上記連結アンチセンスRNAとグルテリンAのセンスRNAとの混合液を用いてin vitroで翻訳反応を行い、グルテリン合成量を調査した。
- 15 (e) グルテリンプロモーターの下流にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン(Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813)を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンAのc DNAの5' 上流312 bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結させた。ノバリン合成酵素のターミネーターを付加して発現プラスミドベクターを作製した。同様にして、完全長グルテリンBのc DNAの5' 上流287 bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結させたアンチセンス遺伝子を作製し、上記発現プラスミドベクターに挿入した。
- 20 (f) 上記プラスミドベクターをイネに形質転換し、得られたコメのグルテリン含量を調査した。

25 実施例1：in vitroでの連結アンチセンスRNAの効果

(1) in vitroによるRNA合成

(1-1) グルテリンAセンスmRNAの合成

ブルースクリプト (TOYOB0社製) のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトEcoRI/BamHI部位に完全長のグルテリンAのc DNAをセ

ンス方向に挿入した (図1 : Glu sense RNA)。転写反応は、上記のDNA溶液 (50 μl, DNA 5 μgを含む) に、20mMのATP/CTP/GTP混合液 (4 μl)、2.5mMのGTP (1 μl)、5mMのCap analog (5 μl)、0.5MのDTT (1 μl)、RNaseインヒビター (50 ユニット)、T7 RNAポリメラーゼ (10 ユニット) を加え、反応混合液を 37°Cで30分インキュベーションした後、20mMのGTP (1 μl) を加え、さらに37°Cで4.5時間インキュベートして行った。

（1-2）グルテリンAアンチセンスRNAの合成

ブルースクリプト (TOYOB0社製) のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトBamHI/EcoRI部位に完全長のグルテリンAのcDNAをアンチセンスの方向に挿入した (anti-full RNA)。また、グルテリンAのcDNAの5'端より312bpsの配列をアンチセンスの方向に1個 (antix1 RNA)、4個 (antix4 RNA)、8個 (antix8 RNA) をそれぞれ直列に連結させた (図1)。まず、グルテリンAのcDNAの5'末端より312bpsの位置にあるSstI部位にXbaIリンカー (CTCTAGAG) を付加し、そのBamHI/XbaI断片をブルースクリプト (TOYOB0社製) のT7プロモーターの下流のマルチクローニングサイトXbaI/BamHIに挿入して antix1 RNA プラスミドを作製した。さらに、グルテリンAのcDNAの5'末端より312bpsの位置にあるSstI部位にBamHIリンカー (CGGATCCG) を付加し、そのBamHI/ScaI断片を、上記 antix1 RNA プラスミドのBamHI/SmaI部位に挿入し、antix2 RNA プラスミドを作製した。このXbaI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIで処理した断片を antix2 RNA プラスミドのPstI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、EcoRIで処理した部位に挿入し、antix4 RNA プラスミドを作製した。このXbaI部位をDNAポリメラーゼで平滑化した後、XhoIで処理した断片を antix4 RNA プラスミドのHincII/XhoI部位に挿入し、antix8 RNA プラスミドを作製した。

転写反応は、それぞれのプラスミド (DNA 5 μg) に20mMのATP/CTP/UTP/GTP混合液 (5 μl)、0.5MのDTT (1 μl)、RN

aseインヒビター（50ユニット）、T7 RNAポリメラーゼ（10ユニット）を加え、37℃で5時間インキュベートして行った。

（2）小麦胚芽抽出液によるin vitro翻訳反応

グルテリンへの翻訳活性を有するGlu sense RNA（2ピコモル）に対して、グルテリンのアンチセンスRNAであるanti-full RNA、antix1 RNA、antix4 RNAおよびantix8 RNAをそれぞれ0.2ピコモル、0.5ピコモル、1ピコモルおよび2ピコモルになるように混合した後、小麦胚芽抽出液（アマシャム社）による翻訳反応を行った。翻訳反応は1mMのアミノ酸混合液（メチオニンを除いた19種類）2μl、35S-メチオニン（1000ci/mmol）0.5μlに小麦胚芽抽出液15μlを加え30℃で1時間インキュベートして行った。反応液に20%のSDS（2.5μl）を加え、95℃で5分間処理した後、翻訳産物を13%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。イメージアナライザ（富士写真フィルム）により、放射能の検出、測定を行った。

（3）in vitroでのアンチセンスRNA効果の解析

上記RNAを用いて行った小麦胚芽抽出液による翻訳産物の合成量をイメージアナライザによって解析した（図2）。RNAを添加していないレーンにはバンドは出現しなかったが（レーン1）、グルテリンのsense RNAのみを加えるとグルテリンのバンドが出現した（レーン2）。さらに、添加したアンチセンスRNAのモル数の上昇にともなってグルテリンのバンドも薄くなることが示された（レーン3～6）。

グルテリンバンドの放射線量を測定し、各条件でのグルテリン合成量を調査した。結果はアンチセンスRNAを加えていない時のグルテリンの合成量を100としたときの、各条件におけるグルテリン合成量をグラフで示した（図3）。グルテリンAのcDNAの5'上流312bpsの配列の連結数を多くするほど、グルテリン合成量は低下した。また、グルテリン完全長のアンチセンスRNAよりも、5'上流の312bpsの配列を4個、あるいは8個連結させたアンチセンスRNAの方が低減効果が高かった。

実施例2：グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換用 8 連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーター(高岩ら (1987) FEBS Lett. 221: 43-47)の下流の S c a I / X b a I 部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン (Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813) を含む Sma I / Xba I 断片を 5 挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンAの cDNA の 5' 上流 312 bp s の配列をアンチセンスの方向に 8 個連結させた Xba I / Sac I 断片を挿入した。ノパリン合成酵素のターミネーター (Depickerら (1982) J. Mol. Appl. Genet. 561-573) を含む Sac I / Eco RI 断片を付加した後、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子との同時形質転換用プラスミドベクターへ組み込み、pSBHC 10 I x 8 A を作製した (図4)。このプラスミド中に挿入した上記イントロンは、グルテリンAアンチセンス遺伝子の発現活性を増大させる役割を果たす。

(2) 形質転換用完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

グルテリンプロモーターの下流の S c a I / X b a I 部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン (Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-8 15 13) を含む Sma I / Xba I 断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンAの cDNA の Sac I / Xba I 断片をアンチセンスの方向に結合させた。ノパリン合成酵素のターミネーターを含む Sac I / Eco RI 断片を付加した後、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子との同時形質転換用プラスミドベクターへ組み込み、pSBHC I - FA を作製した (図4)。

20 (3) イネへの形質転換

上記プラスミドベクター pSBHC I x 8 A および pSBHC I - FA を保持したアグロバクテリウム LBA4404 を用いて、水稻品種「月の光」へ Hiei et al. (Plant J. 6, 271-282 (1994)) の方法により形質転換を行った。形質転換カルスの選抜はハイグロマイシンを用いて Hiei et al. (同上) の方法に従い行った。

25 (4) DNA および RNA の調製

形質転換体からの DNA の調製は閉鎖系温室でのポット栽培に移る前の再分化幼植物体を用いて行った。

RNA の調製は SDS - フェノール法 (植物遺伝子工学マニュアル、講談社、

内宮ら)により行った。

(5) 形質転換体のPCR分析、およびノーザン分析

PCR反応によりグルテリンアンチセンス遺伝子の配列を増幅させることにより形質転換の確認を行った。ゲノムDNA (120 ng)、4種dNTPs (2 5 0.0 μM)、プライマー (10 pmol/反応)、Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造) (1 unit) を加え、94°C、50°C、72°C各2分の反応を1サイクル行った後、各1分の反応を34サイクル行った。8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の増幅には、

5' -AGTGGGCTGCAGGAATTCTGATATCAAGCTT-3' (SEQ ID NO:3)

10 5' -AGTACATAGCAGCAAAACAT-3' (SEQ ID NO:4)

のプライマーを、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の増幅には、

5' -TACATAGCTTAACTGATAATCTGA-3' (SEQ ID NO:5)

5' -AGTACATAGCAGCAAAACAT-3' (SEQ ID NO:6)

のプライマーを用いて行った。

15 ノーザン分析は全RNA (20 μg) を1%アガロースゲルで電気泳動した後、定法に従い行った。8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の導入が確認された形質転換体、および対照としてハイグロマイシン抵抗性遺伝子のみが導入された形質転換体の開花8日目の未熟種子より、それぞれ調製した全RNAを用いて行った。プローブはグルテリンAのcDNAの5' 上流の312 bpsの配列を用いて行った。

ノーザン分析に用いたプローブはDNA断片25 ngをレディプライムDNAラベリングシステム (アマシャム) により³²Pラベルした。

(6) 8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出

25 ハイグロマイシンに耐性を示したカルスより再分化させたところ、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を形質転換したカルスより、独立な再分化個体が20系統得られた。アンチセンス遺伝子導入の確認のために、PCR反応を行った後、アガロース電気泳動により分離した結果を図5に示した。導入に用いたアンチセンス遺伝子を保持したプラスミドを鋳型にPCR反応を行ったレーンでは、期待される約1.2 kbpsの位置にバンドが現れた (図5:レーン2)。形質

転換体20系統も同じ1.2 k b p sの位置にバンドが現れた（図5：レーン3～22）。また、非形質転換体より調製したDNAを鋳型にして行ったPCR反応のレーンではバンドは現れなかった（図5：レーン23）。

したがって、形質転換体20系統は8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を5保持していると結論された。

（7）完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出
ハイグロマイシンに耐性を示したカルスより再分化させたところ、完全長グル10テリンAアンチセンス遺伝子を形質転換したカルスより、独立な再分化個体が18系統得られた。アンチセンス遺伝子導入の確認のために、PCR反応を行った後、アガロース電気泳動により分離した結果を図6に示した。導入用いたアン15チセンス遺伝子を保持したプラスミドを鋳型にPCR反応を行ったレーンでは、期待される約1.7 k b p sの位置にバンドが現れた（図6：レーン2）。形質転換体18系統も同じ1.7 k b p sの位置にバンドが現れた（図6：レーン3～20）。また、非形質転換体より調製したDNAを鋳型にして行ったPCR反応のレーンではバンドは現れなかった（図6：レーン21）。

したがって、形質転換体18系統は完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子を保持していると結論された。

（8）形質転換体未熟種子中の転写物量の解析

対照5系統、および形質転換体10系統を供試したノーザン分析の結果を図720に示した。8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体ではグルテリンAのmRNA量が対照5系統（図7：レーン1～5）に比べて明らかに低減していた（図7：レーン6～15）。シグナルの強度をバイオイメージングアナライザーバス1000（富士写真フィルム社製）によって測定した結果を表1に示した。結果は対照5系統の平均値を100としたときの値で示した。導25入した8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の作用により、形質転換体では未熟種子中のグルテリンAのmRNA量が特異的に低減していることが確認された。

表1：未熟種子中の転写物量

対照	レーン番号									
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
100	31.1	11.9	13.1	11.7	10.0	7.7	8.2	3.8	3.0	1.2

(9) 種子タンパク質含量の測定

自殖種子の玄米を粉碎し、その50mgより抽出したタンパク質を14%ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンシトメーター Model GS-670 (

5 B I O - R A D 社) を用いて測定した。

結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を100としたときの百分率によって示した(表2および3)。

グルテリン含有量は8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均63.2%に、完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均75.4%に低減していた。

また、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子、および完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のグルテリン含有量について、統計処理を行ったところ、8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体のグルテリン含有量の方が10%水準で有意に低いことが確認された。

表2：形質転換体のグルテリン含有量(対照を100とする)

8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量	系統番号	グルテリン含有量
1	59.9	11	66.0
2	66.9	12	76.2
3	42.3	13	48.1
4	42.6	14	83.4
5	66.6	15	71.7

6	77. 0	16	98. 2
7	39. 7	17	67. 8
8	40. 1	18	61. 0
9	55. 5	19	93. 2
<u>10</u>	<u>46. 1</u>	<u>20</u>	<u>61. 2</u>

表3：形質転換体のグルテリン含有量（対照を100とする）

完全長グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量	系統番号	グルテリン含有量
1	95. 2	10	77. 9
2	38. 9	11	59. 3
3	107. 2	12	60. 3
4	56. 3	13	41. 2
5	96. 2	14	96. 2
6	110. 6	15	60. 5
7	73. 6	16	114. 3
8	72. 1	17	47. 4
9	66. 6	18	83. 0

実施例3：グルテリンAおよびBアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作
出と解析

(1) 形質転換用8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の構築

5 グルテリンプロモーターの下流のSma I / Xba I部位にヒマカタラーゼ遺
伝子の第1イントロン (Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-8
13) を含むSma I / Xba I断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリ
ンBのcDNAの5'上流287bpsの配列をアンチセンスの方向に8個連結
させたXba I / Sph I断片を挿入した。ノバリン合成酵素のターミネーター
を含むSph I / Hind III断片を付加した後、実施例2で作製したプラス

ミドベクターpSBHC1 x 8AのHindIII部位に挿入し、pSBHC1 x 8ABを作製した(図8)。

(2) 形質転換用完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の構築

5 グルテリンプロモーターの下流のSacI/XbaI部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン(Ohta S. et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31, 805-813)を含むSmaI/XbaI断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンBのcDNAのSphI/XbaI断片をアンチセンスの方向に結合させた。ノパリン合成酵素のターミネーターを含むSphI/HindIII断片を付加した後、実施例2で作製したプラスミドベクターpSBHC1-FAのHindIII部位に挿入し、pSBHC1-FABを作製した(図8)。

(3) イネへの形質転換

10 上記プラスミドベクターpSBHC1 x 8ABおよびpSBHC1-FABを保持したアグロバクテリウムLB4404を用いて、水稻品種「月の光」へ Hiei et al. (Plant J. 6:271-282(1994)) の方法により形質転換を行った。形質転換カルスの選抜はハイグロマイシンを用いて Hiei et al. の方法に従い行った。

(4) 種子タンパク質含量の測定

15 得られた形質転換体より自殖種子の玄米を粉碎し、その50mgより抽出したタンパク質を14%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、ゲルをクマシーブルーで染色した。ゲル上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンシトメーター Model GS-670 (BIO-RAD 社製) を用いて測定した。

20 結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を100としたときの百分率によって示した(表4)。

25 グルテリン含有量は8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の場合、平均57.1%に、完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子の場合、平均69.3%に低減していた。

また、8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子、および完全長グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のグルテリン含有量について、統計処理を行ったところ、8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子導入形質転換体のグルテリン含有量の方が10%水準で有意に低いことが確認された。

表4：グルテリン含有量

	平均値
非形質転換体	100
8連結グルテリンA・Bアンチセンス	
遺伝子導入形質転換体	57.1
完全長グルテリンA・Bアンチセンス	
遺伝子導入形質転換体	69.3

実施例4：グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換用2連結グルテリンA、および4連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の構築

5 グルテリンプロモーターの下流の Sca I, Xba I 部位にヒマカタラーゼ遺伝子の第1イントロン (Ohta S. et al. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31, 805-813) を含む Sma I, Xba I 断片を挿入し、さらにその下流に完全長グルテリンA c DNA の 5' 上流 312bps の配列をアンチセンスの方向に 2 個、あるいは 4 個連結させた Xba I, Sac I 断片を挿入した。ノパリン合成酵素のターミネーターを含む Sac I, EcoR I 断片を付加した後、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子との同時 10 形質転換用プラスミドベクターへ組み込み、pSBHClx2A および pSBHClx4A を作製した。

(2) イネへの形質転換

15 上記プラスミドベクター pSBHClx2A、および pSBHClx4A を保持したアグロバクテリウム LBA4404 を用いて、水稻品種「月の光」へ Hiei et al. (*Plant J.* 6, 271-282 (1994)) の方法により形質転換を行った。形質転換カルスの選抜はハイグロマイシンを用いて Hiei et al. (同上) の方法に従い行った。

(3) 種子タンパク質含量の測定

20 得られた形質転換体より自殖種子の玄米を粉碎し、その 50mg より抽出したタンパク質を 14 % ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後、ゲルをクマシープルーで染色した。ゲル上のグルテリンの相対タンパク質含量はデンシトメーター

Model GS-670 (BIO-RAD) を用いて測定した。

結果は非形質転換体の自殖種子のグルテリン含有量を 100 としたときの百分率によって示した (表5、6)。

5 グルテリン含有量は2連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均 71.7 %に、4連結グルテリンAアンチセンス遺伝子の場合、平均 71.5 %に低減していた。

表5. 形質転換体のグルテリン含有量 (対照を 100 とする)
2連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号	グルテリン含有量
1	66.5
2	66.2
3	67.5
4	93.8
5	64.2
6	60.6
7	75.0
8	79.5
平均	71.7

表6. 形質転換体のグルテリン含有量（対照を 100 とする）
4連結グルテリンAアンチセンス遺伝子導入形質転換体

系統番号 グルテリン含有量	
1	54.7
2	89.0
3	93.9
4	64.1
5	68.0
6	66.7
7	67.0
8	73.1
9	67.0
平均	71.5

発明の効果

本発明のアンチセンス塩基配列は、所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結されたアンチセンス塩基配列であるので、本発明のアンチセンス塩基配列より転写されるアンチセンスRNAは、1分子中に目的タンパク質をコードするmRNAの一部分に対して相補的なRNA配列が複数個連続して存在する。したがって、目的タンパク質をコードするmRNAと生体内で対合し、該タンパク質の生体内での発現を抑制する可能性を高くすることができると考えられる。このため、この連続配列を持ったアンチセンスRNAは連続配列を持たないアンチセンスRNAよりも目的タンパク質の合成を抑制する効果を上げることができる。

本明細書中では主として植物タンパク質の合成抑制を例として説明されている

が、本発明のアンチセンス塩基配列は動物のタンパク質合成の抑制にも使用できる。例えば、ミルク中の特定のタンパク質の合成を抑制したり、免疫疾患、病原因子による疾患等における治療を目的として特定のタンパク質の発現を抑制するために、本発明のアンチセンス塩基発現を使用できることは言うまでもない。

配列表

配列番号 1

配列の長さ : 1 6 4 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 :

性質 : グルテリンAのcDNA

配列の特徴

配列

AAGTACGACG AAAATTCA	T AGTACTACAA CAAC ATG GCA TCC ATA AAT CGC CCC	55
ATA GTT TTC	TTC ACA GTT TGC TTG TTC CTC TTG TGC AAT GGC TCT CTA	103
Ile Val Phe	Phe Thr Val Cys Leu Phe Leu Leu Cys Asn Gly Ser Leu	
10	15	20
GCC CAG CAG CTA TTA GGC CAG AGC ACT AGT CAA TGG CAG AGT TCT CGT	151	
Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gln Ser Thr Ser Gln Trp Gln Ser Ser Arg		
25	30	35
CGT CGA AGT CCA AGA GAA TGC AGG TTC GAT AGG TTG CAA GCA TTT GAG	199	
Arg Gly Ser Pro Arg Glu Cys Arg Phe Asp Arg Leu Gln Ala Phe Glu		
40	45	55
CCA ATT CGG AGT GTG AGG TCT CAA GCT GGC ACA ACT GAG TTC TTC GAT	247	
Pro Ile Arg Ser Val Arg Ser Gln Ala Gly Thr Thr Glu Phe Phe Asp		
60	65	70
GTC TCT AAT GAG CAA TTT CAA TGT ACC GGA GTC TCT GTT GTC CGT CGA	295	
Val Ser Asn Glu Gln Phe Gln Cys Thr Gly Val Ser Val Val Arg Arg		
75	80	85

GTT ATT GAA CCT AGA GGC CTT CTA CTA CCC CAT TAC ACT AAT GGT GCA	343		
Val Ile Glu Pro Arg Gly Leu Leu Leu Pro His Tyr Thr Asn Gly Ala			
90	95	100	
TCT CTA GTA TAT ATC ATC CAA GGG AGA GGT ATA ACA GGG CCA ACT TTC	391		
Ser Leu Val Tyr Ile Ile Gln Gly Arg Gly Ile Thr Gly Pro Thr Phe			
105	110	115	
CCA CGC TGT CCT GAG TCC TAC CAA CAA CAG TTC CAA CAA TCA GGC CAA	439		
Pro Gly Cys Pro Glu Ser Tyr Gln Gln Phe Gln Gln Ser Gly Gln			
120	125	130	135
GCC CAA TTG ACC GAA AGT CAA AGC CAA AGT CAA AAG TTC AAG GAT GAA	487		
Ala Gln Leu Thr Glu Ser Gln Ser Gln Lys Phe Lys Asp Glu			
140	145	150	
CAT CAA AAG ATC CAC CGT TTC AGA CAA GGA GAT GTC ATT GCA TTG CCT	535		
His Gln Lys Ile His Arg Phe Arg Gln Gly Asp Val Ile Ala Leu Pro			
155	160	165	
GCT GGT GTA GCT CAT TGG TGC TAC AAT GAT GGT GAA GTG CCA GTT GTT	583		
Ala Gly Val Ala His Trp Cys Tyr Asn Asp Gly Glu Val Pro Val Val			
170	175	180	
GCC ATA TAT GTC ACT GAT CTC AAC AAC GGT GCT AAT CAA CTT GAC CCT	631		
Ala Ile Tyr Val Thr Asp Leu Asn Asn Gly Ala Asn Gln Leu Asp Pro			
185	190	195	
AGG CAA AGG GAT TTC TTG TTA GCT GGA AAT AAG AGA AAC CCT CAA GCA	679		
Arg Gln Arg Asp Phe Leu Leu Ala Gly Asn Lys Arg Asn Pro Gln Ala			
200	205	210	215
TAC AGG CGT GAG GTT GAG GAG CGG TCA CAG AAC ATA TTT AGT GGC TTT	727		
Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Arg Ser Gln Asn Ile Phe Ser Gly Phe			
220	225	230	
AGC ACT GAA CTA CTT AGC GAG GCT CTT GGC GTA AGC GGC CAA GTG GCA	775		
Ser Thr Glu Leu Leu Ser Glu Ala Leu Gly Val Ser Gly Gln Val Ala			
235	240	245	
AGG CAG CTC CAA TGT CAA AAT GAC CAA AGA GGA GAA ATT GTC CGT GTC	823		
Arg Gln Leu Gln Cys Gln Asn Asp Gln Arg Gly Glu Ile Val Arg Val			
250	255	260	

GAA CAC GGG CTC AGT TTG CTG CAG CCA TAT GCA TCA TTG CAG GAG CAG	871		
Glu His Gly Leu Ser Leu Leu Gln Pro Tyr Ala Ser Leu Gln Glu Gln			
265	270	275	
GAA CAA GGA CAA GTG CAA TCA AGA GAG CGT TAT CAA GAA GGA CAA TAT	919		
Glu Gln Gly Gln Val Gln Ser Arg Glu Arg Tyr Gln Glu Gly Gln Tyr			
280	285	290	295
CAG CAA ACT CAA TAT GGA AGT GGC TGC TCT AAC GGT TTG GAT GAG ACC	967		
Gln Gln Ser Gln Tyr Gly Ser Gly Cys Ser Asn Gly Leu Asp Glu Thr			
300	305	310	
TTT TGC ACC CTG AGG GAA AAC ATC GAT AAT CCT AAC CGT GCT	1015		
Phe Cys Thr Leu Arg Val Arg Gln Asn Ile Asp Asn Pro Asn Arg Ala			
315	320	325	
GAT ACA TAC AAT CCA AGA GCT GGA AGG GTT ACA AAT CTC AAC ACC CAG	1063		
Asp Thr Tyr Asn Pro Arg Ala Gly Arg Val Thr Asn Leu Asn Thr Gln			
330	335	340	
AAT TTC CCC ATT CTC AGT CTT GAA CAG ATG AGT GCA GTC AAA GAA AAT	1111		
Asn Phe Pro Ile Leu Ser Leu Val Gln Met Ser Ala Val Lys Val Asn			
345	350	355	
CTA TAC CAG AAT GCA CTC CTT TCA CCA TTT TGG AAC ATC AAC GCT CAC	1159		
Leu Tyr Gln Asn Ala Leu Leu Ser Pro Phe Trp Asn Ile Asn Ala His			
360	365	370	375
AGC GTC GTG TAT ATT ACT CAA GGC CGT GCC CGG GTT CAA GTT GTC AAC	1207		
Ser Val Val Tyr Ile Thr Gln Gly Arg Ala Arg Val Gln Val Val Asn			
380	385	390	
AAC AAT GGA AAG ACA GTG TTC AAC GGC GAG CTT CGC CGC GGA CAG CTG	1255		
Asn Asn Gly Thr Val Phe Asn Gly Glu Leu Arg Arg Gly Gln Leu			
395	400	405	
CTT ATT ATA CCA CAA CAC TAC GCA GTT GAA AAG AAC GCA CAA AGA GAA	1303		
Leu Ile Ile Pro Gln His Tyr Ala Val Val Lys Ala Gln Arg Glu			
410	415	420	
GGA TGT GCT TAC ATT GCA TTC AAG ACC AAT CCT AAC TCT ATG GAA AGC	1351		
Gly Cys Ala Tyr Ile Ala Phe Lys Thr Asn Pro Asn Ser Met Val Ser			
425	430	435	

CAC ATT GCA GGA AAG AGT TCC ATC TTC CGT GCT CTC CCA AAT GAT GTT 1399
 His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Phe Arg Ala Leu Pro Asn Asp Val
 440 445 450 455
 CTA GCA AAT GCA TAT CGC ATC TCA AGA GAA GAG GCT CAG AGG CTC AAG 1447
 Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Glu Glu Ala Gln Arg Leu Lys
 460 465 470
 CAT AAT AGA GGA GAT GAG TTC GGT GCA TTC ACT CCA ATC CAA TAC AAG 1495
 His Asn Arg Gly Asp Glu Phe Gly Ala Phe Thr Pro Ile Gln Tyr Lys
 475 480 485
 AGC TAC CAA GAC GTT TAT AAT GCG GCA GAA TCC TCT TAG GTCGGCTTGC GG 1546
 Ser Tyr Gln Asp Val Tyr Asn Ala Ala Glu Ser Ser Stop
 490 495 500
 ATAAAGAATA ACTAAATAAA TAAATTGCAA GCAATTGTTT TGCTGCTATG TACTGTCCAG 1606
 TCTTTCGACT AATGATGATA AAGCCTCTCT TTATCCTT 1644

配列番号2

配列の長さ：1634

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：

性質：グルテリンBのcDNA

配列の特徴

配列

GTACAAATAG CT ATG GCG AGC TCC GTT TTC TCT CGG TTT TCT ATA TAC TTT 51
 Met Ala Ser Ser Val Phe Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Phe
 1 5 10
 TGT GTT CTT CTA TTA TGC CAT GGT TCT ATG GCC CAG CTA TTT AAT CCC 99
 Cys Val Leu Leu Leu Cys His Gly Ser Met Ala Gln Leu Phe Asn Pro
 15 20 25

AGC ACA AAC CCA TCG CAT AGT CCT CGG CAA GGA AGT TTT AGG GAG TGT	147		
Ser Thr Asn Pro Trp His Ser Pro Arg Gln Gly Ser Phe Arg Glu Cys			
30	35	40	45
AGA TTT GAT AGA CTA CAA GCA TTT GAA CCA CTT CCG AAA GTG AGG TCA	195		
Arg Phe Asp Arg Leu Gln Ala Phe Glu Pro Leu Arg Lys Val Arg Ser			
50	55	60	
GAA GCT GGG GTG ACT GAG TAC TTC GAT GAG AAG AAT GAA TTA TTC CAG	243		
Glu Ala Gly Val Thr Glu Tyr Phe Asp Glu Lys Asn Glu Leu Phe Gln			
65	70	75	
TGC ACG GGT ACT TTT GTG ATC CGA CGT GTC ATT CAG CCT CAA GGC CTT	291		
Cys Thr Gly Thr Phe Val Ile Arg Arg Val Ile Gln Pro Gln Gly Leu			
80	85	90	
TTG GTA CCT CGA TAC ACA AAT ATT CCT GGC GTG GTC TAC ATC ATC CAA	339		
Leu Val Pro Arg Tyr Thr Asn Ile Pro Gly Val Val Tyr Ile Ile Gln			
95	100	105	
GGG AGA GGT TCT ATG GGT TTA ACC TTC CCC GGT TGC CCT GCG ACT TAC	387		
Gly Arg Gly Ser Met Gly Leu Thr Phe Pro Gly Cys Pro Ala Thr Tyr			
110	115	120	125
CAG CAA CAA TTC CAA CAA TTT TCA TCT CAA GGC CAA AGT CAG AGC CAA	435		
Gln Gln Gln Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gln Gly Gln Ser Gln Ser Gln			
130	135	140	
AAG TTT AGA GAT GAG CAC CAA AAG ATT CAT CAA TTT AGG CAA GGA GAC	483		
Lys Phe Arg Asp Glu His Gln Lys Ile His Gln Phe Arg Gln Gly Asp			
145	150	155	
ATT GTT GCT CTC CCA GCT GGT GTT GCA CAT TGG TTC TAC AAT GAT GGT	531		
Ile Val Ala Leu Pro Ala Gly Val Ala His Trp Phe Tyr Asn Asp Gly			
160	165	170	
GAT CGC CAT ATT GTT GCC GTA TAT GTT TAT GAC GTA AAC AAC AAC GCC	579		
Asp Arg His Ile Val Ala Val Tyr Val Tyr Asp Val Asn Asn Ala			
175	180	185	
AAT CAG CTT GAA CCT AGG CAA AAG GAG TTC CTA TTA GCC GG AAC AAC	627		
Asn Gln Leu Glu Pro Arg Gln Lys Glu Phe Leu Leu Ala Gly Asn Asn			
190	195	200	205

AAT CGG GCT CAA CAA CAA CAA GCA TAT GGT AGC TCA ATT GAG CAA CAC	675		
Asn Arg Ala Gln Gln Gln Val Tyr Gly Ser Ser Ile Glu Gln His			
210	215	220	
TCT GGG CAA AAC ATA TTC AGC GGA TTT GGT GTT GAG ATG CTA AGT GAG	723		
Ser Gly Gln Asn Ile Phe Ser Gly Phe Gly Val Glu Met Leu Ser Glu			
225	230	235	
GCT TTA GGC ATC AAC GCA GTA GCA GCA AAG AGG CTA CAG AGC CCA AAT	771		
Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Ala Lys Arg Leu Gln Ser Pro Asn			
240	245	250	
GAT CAA AGA GGA GAG ATC ATA CAT GTG AAG AAT GGC CTT CAA TTG TTG	819		
Asp Gln Arg Gly Glu Ile Ile His Val Lys Asn Gly Leu Gln Leu Leu			
255	260	265	
AAA CCG ACT TTG ACA CAA CAG CAA GAA CAA GCA CAA GCA CAA GAT CAA	867		
Lys Pro Thr Leu Thr Gln Gln Gln Glu Gln Ala Gln Ala Gln Asp Gln			
270	275	280	285
TAT CAA CAA GTT CAA TAC AGT GAA CGA CAG CAA ACA TCT TCT CGA TGG	915		
Tyr Gln Gln Val Gln Tyr Ser Glu Arg Gln Gln Thr Ser Ser Arg Trp			
290	295	300	
AAC GGA TTG GAG GAG AAC TTT TGC ACG ATC AAG GTG AGA GTA AAC ATT	963		
Asn Gly Leu Glu Glu Asn Phe Cys Thr Ile Lys Val Arg Val Asn Ile			
305	310	315	
GAA AAT CCT AGT CGT GCT GAT TCA TAC AAC CCA CGT GCC GGA AGG ATA	1011		
Glu Asn Pro Ser Arg Ala Asp Ser Tyr Asn Pro Arg Ala Gly Arg Ile			
320	325	330	
ACA AGT GTC AAT AGT CAG AAG TTC CCC ATC CTT AAC CTC ATC CAA ATG	1059		
Thr Ser Val Asn Ser Gln Lys Phe Pro Ile Leu Asn Leu Ile Gln Met			
335	340	345	
AGC GCT ACC AGA GTA AAC CTA TAC CAG AAT GCT ATT CTC TCG CCG TTC	1107		
Ser Ala Thr Arg Val Asn Leu Tyr Gln Asn Ala Ile Leu Ser Pro Phe			
350	355	360	365
TGG AAC GTC AAT GCT CAT AGT TTG GTC TAT ATG ATT CAA GGG CGA TCT	1155		
Trp Asn Val Asn Ala His Ser Leu Val Tyr Met Ile Gln Gly Arg Ser			
370	375	380	

CGA GTT CAA GTC GTT ACT AAC TTT GGA AAG ACT GTG TTT GAT GGT GTC	1203		
Arg Val Gln Val Val Ser Asn Phe Gly Lys Thr Val Phe Asp Gly Val			
385	390	395	
CTT CGC CCA GGA CAA TTA TTG ATC ATT CCG CAA CAT TAT GCT GTC TTG	1251		
Leu Arg Pro Gly Gln Leu Leu Ile Ile Pro Gln His Tyr Ala Val Leu			
400	405	410	
AAG AAA GCA GAG CGT GAA GGA TGC CAA TAT ATC GCA ATC AAG ACA AAC	1299		
Lys Lys Ala Glu Arg Glu Gly Cys Gln Tyr Ile Ala Ile Lys Thr Asn			
415	420	425	
GCT AAC ACC TTC GTC AGC CAC CTT GCA GGG AAA AAC TCA GTC TTC CGT	1347		
Ala Asn Thr Phe Val Ser His Leu Ala Gly Lys Asn Ser Val Phe Arg			
430	435	440	445
GCC TTG CCA GTT GAT GTC GCT AAT GCG TAT CGC ATC TCA AGG GAG	1395		
Ala Leu Pro Val Asp Val Val Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Glu			
450	455	460	
CAA GCC CGA AGC CTC AAG AAC AGG GGA GAA GAG CAC GGT GCC TTC	1443		
Gln Ala Arg Ser Leu Lys Asn Asn Arg Gly Glu Glu His Gly Ala Phe			
465	470	475	
ACT CCT AGA TTT CAA CAA CAA TAC TAC CCA GGA TTA TCG AAT GAG TCC	1491		
Thr Pro Arg Phe Gln Gln Gln Tyr Tyr Pro Gly Leu Ser Asn Glu Ser			
480	485	490	
GAA AGC GAG ACC TCA GAG TAA TGTAATGTAA TTGAGAACTA GTATCGGCCT AGAG	1546		
Glu Ser Glu Thr Ser Glu Stop			
495	500		
TAAAATAAAA CACCACAACT ATGACACTTG GTGGTGATTG TGTTCGATAT CAGTACTAAA	1606		
TAAAGGTTAC AAACCTCTTA ATTTTCCT	1634		

配列番号 3

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AGTGGGCTGC AGGAATTGCA TATCAAGCTT

30

配列番号 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AGTACATAGC AGCAAAACAT

20

配列番号 5

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

TACATAGCTT TAACTGATAA TCTGA

25

配列番号 6

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AGTACATAGC AGCAAAACAT

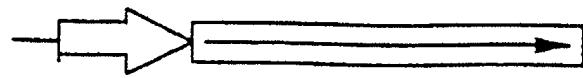
20

請求の範囲

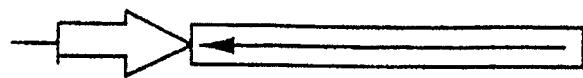
1. 所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含むアンチセンス塩基配列。
2. 所望の構造遺伝子の 5' 側の一部の配列をアンチセンス方向に複数個連続して連結して含む、請求項 1 に記載のアンチセンス塩基配列。
3. 前記一部の配列の長さが 45 塩基以上である、請求項 1 または 2 記載のアンチセンス塩基配列。
4. 前記一部の配列の長さが 300 塩基以上である、請求項 1 または 2 記載のアンチセンス塩基配列。
5. 前記複数個が少なくとも 4 個以上である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列。
6. 前記複数個が少なくとも 8 個以上である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列。
7. 前記の所望の構造遺伝子もしくはその一部の配列が、異なる種類の複数の構造遺伝子もしくはその一部の配列から構成されている、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列。
8. 前記構造遺伝子が植物種子の貯蔵タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列。
9. 前記構造遺伝子がグルテリン A もしくはグルテリン B をコードする遺伝子である、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列。
10. 請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載のアンチセンス塩基配列を有する発現ベクター。
 11. 請求項 10 に記載の発現ベクターにより形質転換された形質転換体。
 12. 形質転換体が植物である、請求項 11 に記載の形質転換体。
 13. 形質転換体がイネである、請求項 11 または 12 に記載の形質転換体。
 14. 請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載されたアンチセンス塩基配列を標的細胞のゲノム遺伝子中に導入することを含む、構造遺伝子がコードするタンパク質の細胞内における発現を抑制する方法。

図 1

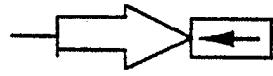
T7 RNA Pol.



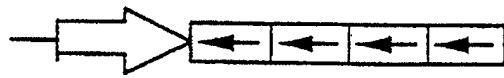
Glu sense RNA



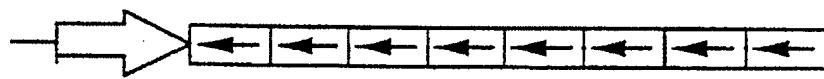
Glu anti -full RNA



Glu anti x1 RNA



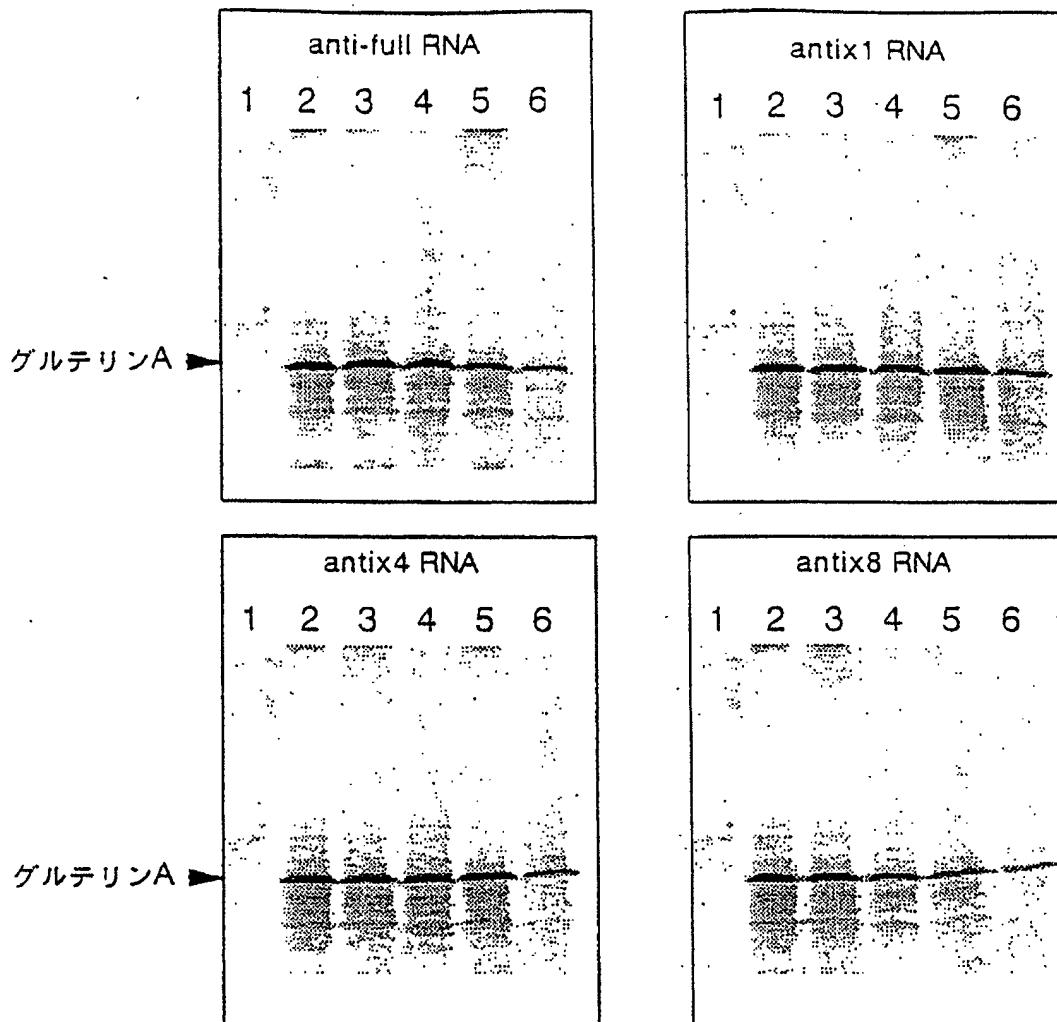
Glu anti x4 RNA



Glu anti x8 RNA

in vitro RNA 合成に用いた遺伝子の構造

図 2



小麦胚芽抽出液による翻訳産物の解析

レーン1 RNA なし

レーン2 ゲルテリン sense RNA のみ (2p moles)

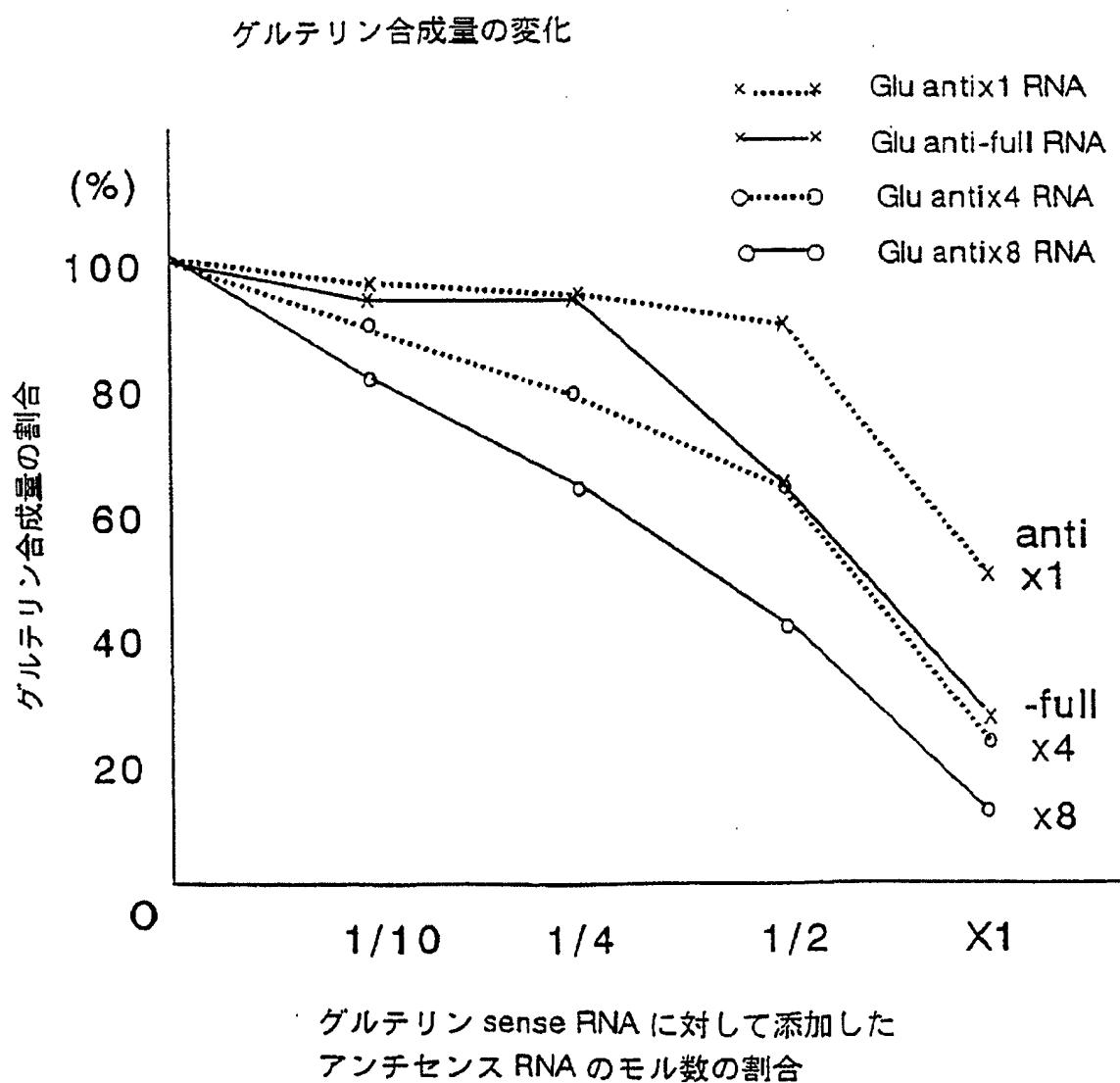
レーン3 アンチセンス RNA 0.2p moles 添加

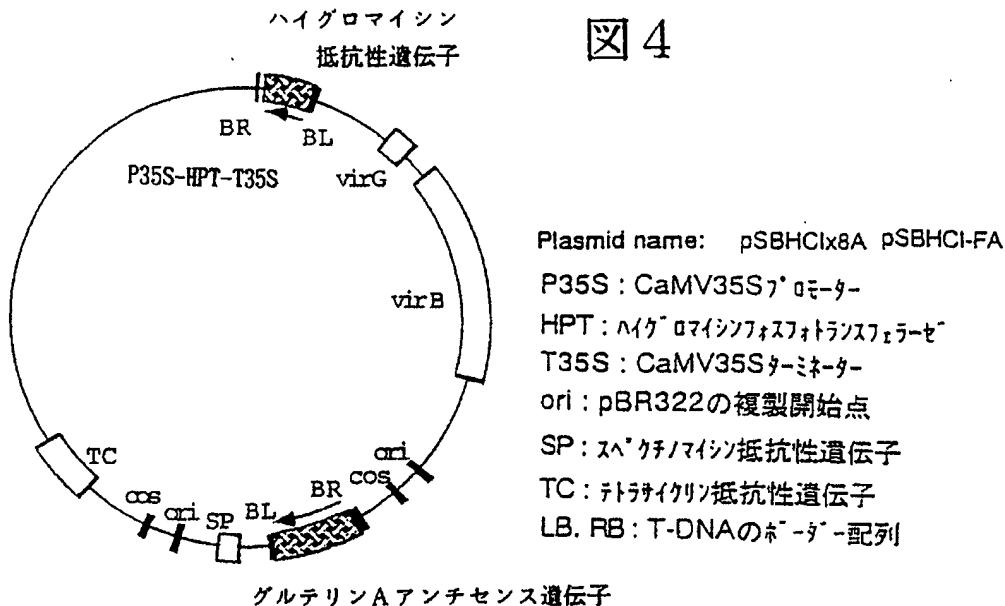
レーン4 アンチセンス RNA 0.5p moles 添加

レーン5 アンチセンス RNA 1p moles 添加

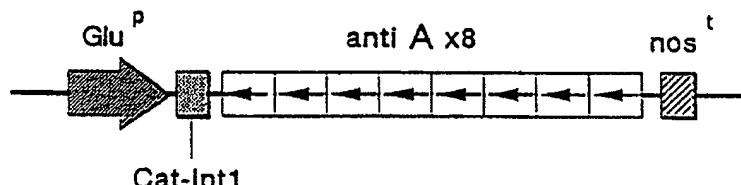
レーン6 アンチセンス RNA 2p moles 添加

図3

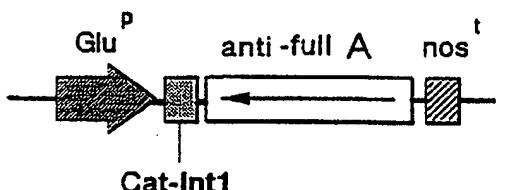




(1) 8連結グルテリンアンチセンス遺伝子(3.7kbp)



(2) 完全長グルテリンアンチセンス遺伝子(2.9kbp)

 Glu^P : グルテリンPプロモーター

anti x8A : グルテリンAの8連結アンチセンス配列

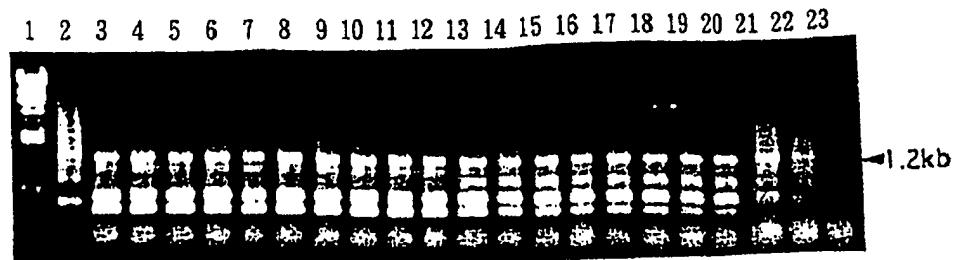
Cat-Int1 : ヒカカラーゼ遺伝子の
第1イントロン

anti-fullA : グルテリンAの完全長アンチセンス配列

 nos^t : ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター

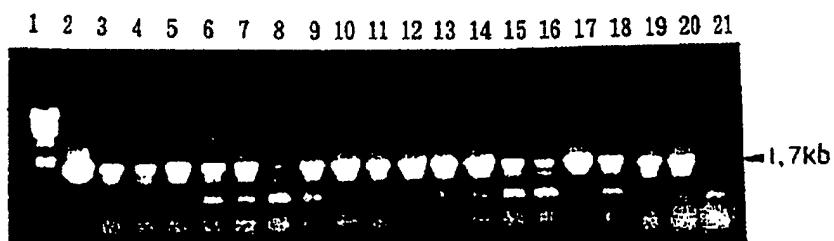
形質転換に用いたプラスミドベクターの構造

図 5



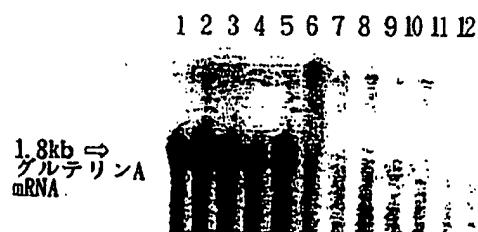
8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析

図 6



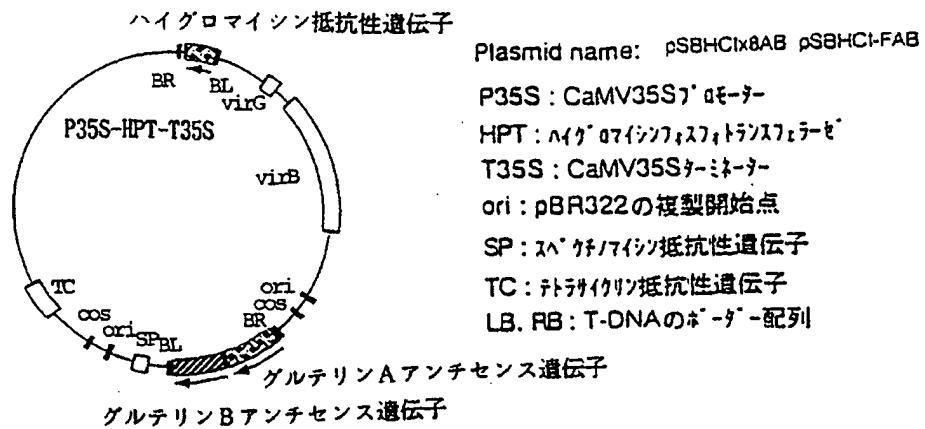
完全長グリテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のPCR分析

図 7

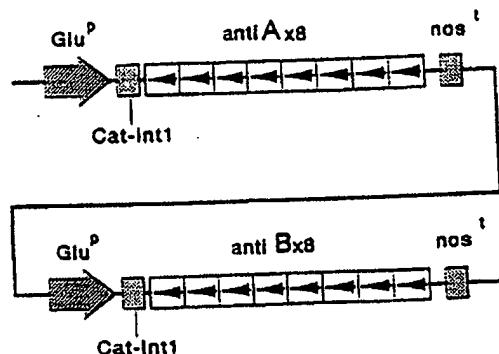


8連結グルテリンAアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体のノーザン分析

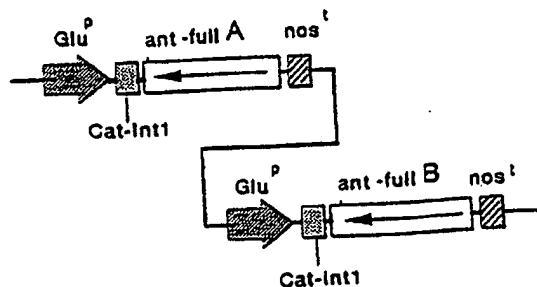
図 8



(1) 8連結グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子(7.4kbp)



(2) 完全长グルテリンA・Bアンチセンス遺伝子(5.8kbp)

Glu^P : グルタミンプロモーター

anti x8A : グルテリンAの8連結アンチセンス配列

Cat-Int1 : ヒトカラセ遺伝子の

anti x8B : グルテリンBの8連結アンチセンス配列

第1イントロン

anti-fullA : グルテリンAの完全長アンチセンス配列

nos' : ナイロン合成酵素遺伝子のターニター

anti-fullB : グルテリンBの完全長アンチセンス配列

形質転換に用いたプラスミドベクターの構造

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/29, C12N15/63, C12N5/10, A01H1/00, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/29, C12N15/63, C12N5/10, A01H1/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-232092, A (The Research Foundation of State University of New York), November 18, 1985 (18. 11. 85), & EP, 140308, A1 & JP, 9-135686, A	1,2,5-7,10, 11,14 3,4,8,9,12, 13
Y	TADA, Y. et al., "Environmental risk evaluation of transgenic rice expressing an antisense gene for 16kDa albumin(I)", Breeding Science (1996) Vol. 46, No. 4, pages 403-407	3,4,8,9, 12,13
Y	OKITA, T.W. et al., "Structure and expression of the rice glutelin multigene family", The Journal of Biological Chemistry (1989), Vol. 264, No. 21, pages 12573-12581	8,9,12,13
Y	HIEI, Y. et al., "Efficient transformation of rice...", Plant Journal (1994) Vol. 6, No. 2	12,13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search June 1, 1998 (01. 06. 98)	Date of mailing of the international search report June 9, 1998 (09. 06. 98)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1* C12N 15/29, C12N 15/63, C12N 5/10, A01H 1/00,
A01H 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1* C12N 15/29, C12N 15/63, C12N 5/10, A01H 1/00,
A01H 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 60-232092, A (ザ リサーチ ファンディション オブ ステイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク) 18. 11月. 1985 (18. 11. 85) & E.P, 140308, A1 & J P, 9-135686, A	1-2, 5-7, 10-11, 14
Y		3-4, 8-9, 12-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 06. 98

国際調査報告の発送日

09.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

小暮 道明



4B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	TADA, Y. et al. "Environmental risk evaluation of transgenic rice expressing an antisense gene for 16kDa albumin(I)", Breeding Science (1996) 第46巻, 第4号, p. 403 - 407	3-4, 8-9 12-13
Y	OKITA, T. W. et al. "Structure and expression of the rice glutelin multigene family", The Journal of Biological Chemistry (1989) 第264巻, 第21号, p. 12573 - 12581	8-9, 12-13
Y	HIEI, Y. et al. "Efficient transformation of rice ...", Plant Journal (1994) 第6巻, 第2号, p. 271 - 282	12-13